

**METHOD AND DEVICE FOR ANALYZING IMMUNITY OF ANTI-SYPHILIS TREPONEMA ANTIBODY**

Patent Number: JP9229938  
Publication date: 1997-09-05  
Inventor(s): HASEGAWA AKIRA; ISOMURA MITSUO; ASHIHARA YOSHIHIRO  
Applicant(s):: FUJIREBIO INC  
Requested Patent: ☐ JP9229938  
Application Number: JP19960352593 19961216  
Priority Number(s):  
IPC Classification: G01N33/571 ; G01N33/543  
EC Classification:  
Equivalents:

**Abstract**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To make it possible to simply detect anti-syphilis Treponema in a short time by providing a labeled reagent zone and a detecting zone on a matrix having a capillarity, and detecting antisiphilms Treponema antibody in a specimen coupled to the detecting zone by adding the specimen.

**SOLUTION:** A matrix 1 is formed of a transfusible water absorbing material by capillarity, and a specimen point adhering zone 3, a labeled reagent zone 4, a detecting zone 5, and a development liquid absorbing zone 6 are provided along the development liquid transfusion direction from the development liquid zone 2 thereon. The zone 4 includes a labeled genetic recombination syphilis Treponema antigen, and the zone 5 is fixed with syphilis Treponema antigen to the matrix 1. At the time of starting the measurement, the zone 2 is dipped in a vessel filled with the development liquid, and the development liquid of the quantity arriving at the zone 6 is supplied. The zone 6 absorbs the development liquid supplied to the matrix 1 to smoothly analyze it. Thus, the anti- syphilis Treponema antibody in the specimen can be analyzed from the label coupled to the zone 5.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-229938

(43) 公開日 平成9年(1997)9月5日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/571			G 0 1 N 33/571	
33/543	5 2 1		33/543	5 2 1
// C 1 2 N 15/09		9282-4B	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数19 F D (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平8-352593

(22) 出願日 平成8年(1996)12月16日

(31) 優先権主張番号 特願平7-348528

(32) 優先日 平7(1995)12月20日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000237204

富士レビオ株式会社

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号

(72) 発明者 長谷川 晃

東京都新宿区西新宿2丁目7番1号 富士  
レビオ株式会社内

(72) 発明者 磯村 光男

東京都新宿区西新宿2丁目7番1号 富士  
レビオ株式会社内

(72) 発明者 芦原 義弘

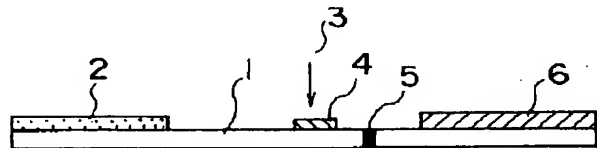
東京都新宿区西新宿2丁目7番1号 富士  
レビオ株式会社内

(54) 【発明の名称】 抗梅毒トレポネーマ抗体の免疫分析方法及び免疫分析装置

## (57) 【要約】

【課題】 検体中の抗梅毒トレポネーマ抗体の測定を簡便な操作で短時間に行うための分析方法とその分析装置の提供。

【解決手段】 毛細管作用により輸液可能なマトリックス1に展開液ゾーン2と、標識された遺伝子組換え梅毒トレポネーマ抗原からなる標識試薬ゾーン4と、梅毒トレポネーマ抗原をマトリックスに固定した検出ゾーン5と、検体点着ゾーン3と、展開液吸収ゾーン6とを設けた免疫分析装置を用いて測定を行い検出ゾーン5に結合した標識物から検体中の抗梅毒トレポネーマ抗体を分析する。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 毛細管作用により輸液可能なマトリックスに標識された遺伝子組換え梅毒トレポネーマ抗原からなる標識試薬ゾーンと、梅毒トレポネーマ抗原をマトリックスに固定した検出ゾーンとを設けてなる抗梅毒トレポネーマ抗体の免疫分析装置に、検体を添加し、検出ゾーンに結合した検体中の抗梅毒トレポネーマ抗体の検出を行うことを特徴とする免疫分析方法。

【請求項2】 毛細管作用により輸液可能なマトリックスに基質を含む展開液ゾーンと、酵素標識された遺伝子組換え梅毒トレポネーマ抗原からなる標識試薬ゾーンと、梅毒トレポネーマ抗原をマトリックスに固定した検出ゾーンと、検体点着ゾーンと、展開液吸収ゾーンとを設けてなる抗梅毒トレポネーマ抗体の免疫分析装置を用いて、前記検体点着ゾーンに検体液を点着した後、前記展開液ゾーンに展開液を供給し、検体液中の抗梅毒トレポネーマ抗体に依存する量の前記検出ゾーンに固定化された酵素の活性を基質で検出して行うことを特徴とする免疫分析方法。

【請求項3】 免疫分析装置がマトリックスに展開液ゾーンと、基質ゾーンと、検体点着ゾーンと、酵素標識された遺伝子組換え梅毒トレポネーマ抗原からなる標識試薬ゾーンと、梅毒トレポネーマ抗原をマトリックスに固定した検出ゾーンと、展開液吸収ゾーンとを設けた分析装置である請求項2記載の方法。

【請求項4】 標識試薬ゾーン上に検体点着ゾーンを設けた分析装置を用いる請求項2又は3記載の方法。

【請求項5】 標識試薬ゾーンがマトリックス上に付設した酵素標識された遺伝子組換え梅毒トレポネーマ抗原を含有した吸水性パッドからなる請求項4記載の方法。

【請求項6】 毛細管作用により輸液可能なマトリックスに展開液ゾーンと、放射性同位元素、ラテックス、金属コロイド粒子、蛍光粒子又は着色粒子で標識された遺伝子組換え梅毒トレポネーマ抗原からなる標識試薬ゾーンと、梅毒トレポネーマ抗原をマトリックスに固定した検出ゾーンと、検体点着ゾーンと、展開液吸収ゾーンとを設けてなる抗梅毒トレポネーマ抗体の免疫分析装置を用いて、前記検体点着ゾーンに検体液を点着した後、前記展開液ゾーンに展開液を供給し、検体液中の抗梅毒トレポネーマ抗体に依存する量の前記検出ゾーンに固定化された標識物を検出して行うことを特徴とする免疫分析方法。

【請求項7】 毛細管作用により輸液可能なマトリックスに放射性同位元素、ラテックス、金属コロイド粒子、蛍光粒子又は着色粒子で標識された遺伝子組換え梅毒トレポネーマ抗原と検体とを含む展開溶液を添加するための展開液ゾーンと、梅毒トレポネーマ抗原をマトリックスに固定した検出ゾーンと、展開液吸収ゾーンとを設けてなる抗梅毒トレポネーマ抗体の免疫分析装置を用いて、前記検体展開液ゾーンに前記標識された遺伝子組換

え梅毒トレポネーマ抗原と検体液とを添加し、検体液中の抗梅毒トレポネーマ抗体に依存する量の前記検出ゾーンに固定化された標識物を検出して行うことを特徴とする免疫分析方法。

【請求項8】 検出ゾーンの梅毒トレポネーマ抗原が遺伝子組換え梅毒トレポネーマ抗原である請求項1ないし7のいずれか1項に記載の免疫分析方法。

【請求項9】 遺伝子組換え梅毒トレポネーマ抗原が梅毒トレポネーマ表面抗原の分子量15kDaのTP15抗原、分子量17kDaのTP17抗原、分子量42kDaのTP42抗原、分子量47kDaのTP47抗原及びこれらのTP抗原が2以上融合した融合TP抗原から選ばれる少なくとも1つの抗原である請求項1ないし8のいずれか1項に記載の免疫分析方法。

【請求項10】 毛細管作用により輸液可能なマトリックスに、標識された遺伝子組換え梅毒トレポネーマ抗原からなる標識試薬ゾーンを設けてなる抗梅毒トレポネーマ抗体の免疫分析装置。

【請求項11】 マトリックスに基質を含む展開液ゾーンと、酵素標識された遺伝子組換え梅毒トレポネーマ抗原からなる標識試薬ゾーンと、梅毒トレポネーマ抗原をマトリックスに固定した検出ゾーンと、検体点着ゾーンと、展開液吸収ゾーンとを設けてなる請求項10記載の分析装置。

【請求項12】 マトリックスに展開液ゾーンと、基質ゾーンと、検体点着ゾーンと、酵素標識された遺伝子組換え梅毒トレポネーマ抗原からなる標識試薬ゾーンと、梅毒トレポネーマ抗原をマトリックスに固定した検出ゾーンと、展開液吸収ゾーンとを設けてなる請求項10記載の分析装置。

【請求項13】 マトリックスの標識試薬ゾーン上に検体点着ゾーンを設けてなる請求項11又は12記載の分析装置。

【請求項14】 標識試薬ゾーンがマトリックス上に付設した酵素標識された遺伝子組換え梅毒トレポネーマ抗原を含有した吸水性パッドからなる請求項13記載の分析装置。

【請求項15】 マトリックスに展開液ゾーンと、放射性同位元素、ラテックス、金属コロイド粒子、蛍光粒子又は着色粒子で標識された遺伝子組換え梅毒トレポネーマ抗原からなる標識試薬ゾーンと、梅毒トレポネーマ抗原をマトリックスに固定した検出ゾーンと、検体点着ゾーンと、展開液吸収ゾーンとを設けてなる請求項10記載の分析装置。

【請求項16】 試薬ゾーンが、放射性同位元素、ラテックス、金属コロイド粒子、蛍光粒子又は着色粒子で標識された遺伝子組換え梅毒トレポネーマ抗原を含有し、検体が添加される吸水性パッドからなる試薬ゾーンをマトリックス上に付設し、この試薬ゾーン上に検体点着ゾーンを設けてなる請求項15記載の分析装置。

【請求項17】 マトリックスに放射性同位元素、ラテックス、金属コロイド粒子、蛍光粒子又は着色粒子で標識された遺伝子組換え梅毒トレポネーマ抗原と検体とを含む展開溶液を添加するための展開液ゾーンと、梅毒トレポネーマ抗原をマトリックスに固定した検出ゾーンと、展開液吸収ゾーンとを設けてなる請求項10記載の分析装置。

【請求項18】 検出ゾーンの梅毒トレポネーマ抗原が遺伝子組換え梅毒トレポネーマ抗原である請求項10ないし17のいずれか1項に記載の分析装置。

【請求項19】 遺伝子組換え梅毒トレポネーマ抗原が梅毒トレポネーマ表面抗原の分子量15kDaのTP15抗原、分子量17kDaのTP17抗原、分子量42kDaのTP42抗原、分子量47kDaのTP47抗原及びこれらTP抗原が2以上融合した融合TP抗原から選ばれる少なくとも1つの抗原である請求項10ないし18のいずれか1項に記載の分析装置。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、毛細管作用により輸液可能なマトリックスに標識された遺伝子組換え梅毒トレポネーマ（トレポネーマパリダム；以下TPという）抗原からなる標識試薬ゾーンと、TP抗原をマトリックスに固定した検出ゾーンとを設けた免疫分析装置に、検体を添加し、検出ゾーンに結合した検体中の抗梅毒トレポネーマ抗体（以下抗TP抗体という）の検出を行う免疫分析方法及びその分析を行うための分析装置に関する。

##### 【0002】

【従来の技術】血液や尿等に含まれる生体成分や薬物の分析は、病態の診断や治療経過の判定に重要である。そこでこの生体成分、薬物等を抗原抗体反応を利用し、検体中から簡便に分析する方法として、反応試薬を含浸させたストリップ状のろ紙からなるストリップ分析装置を用いる方法が見出された。この分析法は装置のろ紙上に設けた検体点着ゾーンに検体を加え、溶液を展開させ、ろ紙上に設けた検出ゾーンに表示される発色の度合いから診断する方法である。これらのストリップ分析装置では反応形式に応じた必要試薬（酵素標識抗体、基質、発色試薬等）が含まれるろ紙を用い、その発色から分析を行うため、特別な判定装置を用いない簡便な方法を実施することができる。また、カラーラテックス、金属コロイド等の粒子を標識物として用いる分析方法も知られている。この分析方法では、検出すべき抗原又は抗体と反応する抗体又は抗原を粒子に結合した試薬を用い、検出ゾーンに結合された粒子像を検出することにより行われていた。

【0003】また、従来抗TP抗体の検出には血球にTP菌体成分を結合させたTPHA試薬を用いる方法、人工粒子にTP抗原を結合させて製造した間接凝集免疫測

定試薬を用いる方法、TP抗原結合固相と標識抗グロブリン抗体からなる酵素免疫測定試薬を用いる方法等が知られていた。これらの方法ではいずれも測定を開始して結果を得るまでに2時間以上を要し、判定には測定機器を用いるため、緊急な検査やベッドサイドでの短時間での測定には対応することができなかった。

【0004】従来のストリップ分析装置を用いた抗TP抗体の測定法では、検体中に存在する多量のグロブリンと標識抗体との間で反応が起こり、測定を行うことができなかった。そこで、分析装置に洗浄槽を付加した装置（特開平5-126832号）、展開液に標識物により起こるシグナルを防止するゾーンを設けた装置（特表平1-503439号）等を用いる方法が見出された。

【0005】これらの方法では操作が煩雑であり、測定操作を常に一定の条件で実施することが難しかった。また、検体中に含まれるグロブリン等の影響により感度よく測定を行うには満足することのできる方法ではなかった。この問題を解決するため検体中の抗TP抗体の測定を行うにあたり、固相に結合したTP抗原と標識TP抗原とによりサンドイッチ法で検出することが試みられたが、従来の生体中で培養され得られたTP抗原の混合物に標識物を導入することは容易ではなく、また常に一定の標識物が置換された標識抗原試薬を継続的に得ることができなかった。このようにこれまで標識TP抗原を用いる方法は知られていなかった。

##### 【0006】

【発明が解決しようとする課題】従来の抗TP抗体の測定法は、操作が複雑であり精度の高い分析を短時間に行うとができないという問題がある。本発明の目的は、従来の方法に比べ簡便な操作で短時間で結果が得られる分析法とその分析を実施するための装置を提供することである。

##### 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者等は鋭意研究を行った結果、毛細管作用により輸液可能なマトリックスに標識された遺伝子組換えTP抗原からなる標識試薬ゾーンと、TP抗原をマトリックスに固定した検出ゾーンとを設けてなる抗梅毒トレポネーマ抗体分析装置に、検体を添加し、検出ゾーンに結合した検体中の抗梅毒トレポネーマ抗体の検出を行う免疫分析方法、及び毛細管作用により輸液可能なマトリックスに標識された遺伝子組換えTP抗原からなる標識試薬ゾーンを設けた新たな抗TP抗体の免疫分析装置を見出し本発明を完成した。さらに詳しくは、毛細管作用により輸液可能なマトリックスに基質を含む展開液ゾーンと、酵素標識された遺伝子組換えTP抗原からなる標識試薬ゾーンと、TP抗原をマトリックスに固定した検出ゾーンと、検体点着ゾーンと、展開液吸収ゾーンとを設けてなる抗TP抗体の免疫分析装置を用いて、前記検体点着ゾーンに検体液を点着した後、前記展開液ゾーンに展開液を供給し、検体液中

の抗TP抗体に依存する量の前記検出ゾーンに固定化された酵素の活性を基質で検出して行うことを特徴とする免疫分析方法、及び毛細管作用により輸液可能なマトリックスに放射性同位元素、ラテックス、金属コロイド粒子、蛍光粒子又は着色粒子で標識された遺伝子組換えTP抗原と検体とを含む展開溶液を添加するための展開液ゾーンと、TP抗原をマトリックスに固定した検出ゾーンと、展開液吸収ゾーンとを設けてなる抗TP抗体の免疫分析装置を用いて、前記検体点着ゾーンに検体液を点着した後、前記展開液ゾーンに展開液を供給し、検体液中の抗TP抗体に依存する量の前記検出ゾーンに固定化された標識物を検出して行うことを特徴とする免疫分析方法である。

【0008】以下本発明の免疫分析方法を装置により更に詳細に説明する。この免疫分析装置において、マトリックスは毛細管作用により輸液可能な吸水性材料で構成される。この好ましい材料としては、例えばセルロース、ニトロセルロース等のセルロース又はその誘導体、ガラス繊維等により形成されたろ紙、多孔質膜等である。このマトリックスの大きさには制限はないが、例えば幅3mm~10mm、長さ30mm~100mm程度のストリップ状のものが取扱が容易で好ましい。マトリックスの厚さは100 $\mu$ m~1mmのものをを用いることが好ましい。またマトリックスは、その一部を蛋白質の非特異反応による吸着を防止するために、例えば牛血清アルブミン(BSA)、カゼイン、シュークロース等でブロッキングして用いることもできる。

【0009】(標識試薬ゾーン) 標識試薬ゾーンは、マトリックス上に設けられた標識された遺伝子組換えTP抗原を含むゾーンである。このゾーンは展開液ゾーンからの展開液の輸液方向で検出ゾーンの上流側に設けることができる。このゾーンを設けるには、マトリックスに標識された遺伝子組換えTP抗原を点着する方法、標識された遺伝子組換えTP抗原を含む吸水性のパッドをマトリックス上に付設する方法により行うことができる。

【0010】TP抗原はTPの細胞表面に各種分子量の表面抗原が存在し、主なものとして分子量47kDa (TP47)、42kDa (TP42)、17kDa (TP17)、15kDa (TP15)、50kDa (TPN50)、TnpA等の抗原が知られている。これらの抗原をコードする遺伝子は既にクローニングされており、遺伝子工学的に抗原が生産されている(特表平2-500403号、INFECTION AND IMMUNITY, Vol. 57, No. 17, PP. 3708-3714, 1989; Molecular Microbiology, 4(8), 1371-1379, 1990等参照)。本発明の遺伝子組換えTP抗原は前記各分子量の抗原を例えばノルガード(Norgard)らの方法(INFECTION AND IMMUNITY, Vol. 61, PP. 1202-1210, 1993)に記載の方法に従いベクターに組み込み形質転換した大腸菌を培養し、培養液から周知の方法を組み合わせて精製することにより製

造することができる。また本発明の遺伝子組換えTP抗原には、前記各分子量の抗原蛋白質の誘導体が存在し、例えば蛋白質のN末端にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)が融合したTP抗原を遺伝子工学的に製造したものをを用いることもできる(特開平7-287017号参照)。更に組換えTP抗原は、前記各抗原から選ばれる2以上の抗原を融合させて製造した例えばTP15-17抗原、TP15-42抗原、TP15-47抗原、TP17-47抗原、TP42-47抗原、TP15-17-42抗原、TP15-42-47抗原、TP15-17-47抗原、TP15-42-47抗原、TP15-17-42-47抗原又はこれらの順序を入れ換えた融合TP抗原であってもよい。

【0011】この遺伝子組換えTP抗原には標識物を結合させて試薬とするが、その標識物としては、例えば酵素、放射性同位元素、ラテックス、金属コロイド粒子、蛍光粒子、着色粒子等を挙げることができる。酵素としては酵素免疫測定法(EIA)に用いられる各種酵素を挙げることができ、その酵素として例えばアルカリホスファターゼ、パーオキシダーゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ等を挙げることができる。また放射性同位元素としては、例えばヨウ素、トリチウム、炭素等の同位元素を挙げることができる。ラテックスとしては、例えばポリスチレンラテックス等の高分子化合物の粒子を挙げることができる。金属コロイド粒子は、例えば各種金属コロイドからなる粒子であり、セレンウム、白金、金等の金属コロイドを挙げることができる。粒径は直径10nm~1 $\mu$ mのものをを用いることが好ましい。

【0012】蛍光粒子としては、例えばフルオレセイン、ローダミン、シアン化白金等の蛍光物質を含むポリスチレン、スチレン-ブタジエン共重合体、スチレン-アクリル酸共重合体、ガラス等の粒子を挙げることができる。着色粒子は各種染料又は顔料により着色した有機高分子化合物又は無機化合物で構成される粒子であり、例えばポリスチレン、ポリメチルアクリレート、ポリアキリルアミド、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ガラス等を単独又は混合した材料で構成される。これらの蛍光粒子及び着色粒子の粒径は10nm~1 $\mu$ mのものをを用いることが好ましい。

【0013】また標識物と遺伝子組換えTP抗原との結合方法は、公知の共有結合又は非共有結合を作る方法を利用して製造することができる。結合の方法には、例えばグタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法、マレイミド法、ビリジル-ジスルフィド法、各種架橋剤を用いる方法等を挙げることができる(例えば「蛋白質核酸酵素」別冊31号、37~45頁(1985)参照)。架橋剤を用いる結合方法では、架橋剤としては例えばN-スクシンイミジル-4-マレイミド酪酸(GMBS)、N-スクシンイミジル-6-マレイミドヘキサン酸、N-スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキ

サン-1-カルボン酸等を用いることができる。共有結合による方法では、遺伝子組換えTP抗原に存在する官能基を用いることができる他、組換えTP抗原に例えばチオール基、アミノ基、カルボキシル基、水酸基等の官能基を常法により導入したのち前記結合法により標識遺伝子組換えTP抗原を製造することができる。また非共有結合による方法としては物理吸着法等を挙げることができる。

【0014】遺伝子組換えTP抗原に放射性同位元素を用いて標識する方法としては、例えばボルトンハンター試薬等を用いて行うことができる。

【0015】標識試薬ゾーンに含有される標識遺伝子組換えTP抗原の量は、マトリックスに点着又は吸水性パッドに含有させる方法、検査対象物、測定に用いる検体量により適宜変更することができるが、通常乾燥重量で0.01 $\mu$ g $\sim$ 5 $\mu$ g程度である。標識遺伝子組換えTP抗原は、例えばTP47、TP42、TP17、TP15、TPN50、Tm p A、前記融合TP抗原等の遺伝子組換えTP抗原を標識したものから少なくとも1種類の抗原を標識試薬ゾーンに添加して用いることができる。

【0016】(検体点着ゾーン) 検体点着ゾーンは、展開液ゾーンの展開液の輸液方向の下流側で検出ゾーンの上流側のマトリックスに特に試薬等を含まずに設けることができる。さらに検体点着ゾーンは、展開液ゾーンの展開液輸液方向の下流側で標識試薬ゾーンの上流側、標識試薬ゾーンの下流側で検出ゾーンの上流側又は標識試薬ゾーンの上に設けることができる。また、前記標識試薬ゾーンに検体点着ゾーンを設けた装置では、標識ゾーンとして標識された遺伝子組換えTP抗原を含有する吸水性パッドを付設することが効率よく分析を行う上で好ましい。このパッドを付加する装置では、多量の検体液を点着することができるため、検体中の微量成分を検出感度を高めて分析を行うことができる。この吸水性のパッドとしては、例えばポリビニルアルコール(PVA)、不織布、セルロース等の多孔質の合成又は天然の高分子化合物からなる材料を単独又は組み合わせて構成することができる。このパッドの大きさ及び厚さは限定されないが、通常縦と横が3mm $\sim$ 10mm程度で厚さが0.5mm $\sim$ 4mm程度のパッドを用いることが効率よく測定を行うためには好ましい。

【0017】(検出ゾーン) 検出ゾーンは、展開液の輸液方向で展開液吸収ゾーンの上流側で且つ検体点着ゾーンの下流側であり、TP抗原を固定して設けることができる。このゾーンは、マトリックスに共有結合等の化学結合、物理吸着等の方法により固定化することにより設けることができる。またTP抗原を不溶性の担体に結合させ、これをマトリックス内に含有させてもよい。この不溶性担体としてはゼラチン、アラビアゴム及びヘキサメタリン酸ナトリウムからなる混合物を不溶化して得ら

れる粒子(特公昭63-29223)、ポリスチレンラテックス、各種動物赤血球、ガラス繊維等がある。不溶性の担体とTP抗原との結合には、前記化学結合又は物理吸着により結合させることができる。検出ゾーンは、どのような形状でもよいが、展開液の輸液方向と直交するように線状に形成し、TP抗原を固定することが検出感度を向上させるためには好ましい。

【0018】検出ゾーンには前記したTP47、TP42、TP17、TP15、前記融合TP抗原等の遺伝子組換えTP抗原をそれぞれ単独にマトリックス上に固定し、検出ゾーンを形成することができる。さらにこれらの抗原をマトリックス上の異なる位置にそれぞれ固定し2以上の検出ゾーンを設けることもできる。2以上の検出ゾーンを設けた装置ではそれぞれの抗原に対する抗体を分別して検出することが可能である。さらにこれらの2以上の遺伝子組換えTP抗原を混合して1つの検出ゾーンとすることもできる。またさらにこの検出ゾーンには、遺伝子組換えTP抗原以外に当業者には周知の方法に従い、例えばウサギ辜丸等の生体内で培養したTP(ニコルス株)の菌体を分解し、抽出、遠心分離等の方法を組み合わせて精製し取得した所謂培養TP抗原(特開昭58-71457号公報参照)を用いることができる。

【0019】(展開液ゾーン) 展開液ゾーンは、マトリックスの一端に設けられ展開液が供給されるゾーンである。測定を開始するには、このゾーンを少なくとも展開液吸収ゾーンに達する量の展開液の入った容器に浸し行うことができる。さらに展開液の供給には展開液ゾーンに展開液の入った液槽を付加し、この液槽を破り展開液とマトリックスを接触させることにより測定を開始することもできる。展開液には、界面活性剤、緩衝剤等を適宜含有することができる。緩衝剤を含む緩衝液としては、例えば酢酸緩衝液、ほう酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液、ジエタノールアミン緩衝液等を挙げることができる。また展開液ゾーンには展開液の供給形態によりさらに吸水性のろ紙等を付設することもできる。

【0020】(展開液吸収ゾーン) 展開液吸収ゾーンは、マトリックスの一端に設けられた前記展開液ゾーンに対して他端に設置される。このゾーンはマトリックスに供給される展開液を吸収し分析を円滑に行うために設けられる。展開液吸収ゾーンはマトリックスを長く形成してこのゾーンを確保することもできる。また、マトリックスに吸水性材料を付設し展開を促進することもできる。この吸水性材料を付加する場合には、天然高分子化合物、合成高分子化合物等からなる保水性の高いろ紙、スポンジ等を用いることができる。吸収性材料はマトリックスに積層することにより、小型化した免疫分析装置を製造することができる。

【0021】本発明の装置としては、標識物の種類により各種装置形態をとることができるが、標識物として酵

素を用いる場合には、毛細管作用により輸液可能なマトリックスに基質を含む展開液ゾーンと、酵素標識された遺伝子組換えTP抗原からなる標識試薬ゾーンと、TP抗原をマトリックスに固定した検出ゾーンと、検体点着ゾーンと、展開液吸収ゾーンとを設けた抗TP抗体の免疫分析装置である。

【0022】標識物として前記酵素を用いる装置では酵素活性を測定するために各種基質を用いることができる。この基質としては酵素に対応して以下に示す各種発色基質、蛍光基質、発光基質等を用いることができる。

【0023】(a) 発色基質

パーオキシダーゼ用：過酸化水素と組合せた2, 2'-アジノービス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS)、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジン(TMB)、ジアミノベンチジン(DAB)

アルカリホスファターゼ用：5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸(BCIP)

【0024】(b) 蛍光基質

アルカリホスファターゼ用：4-メチルウムベリフェニル-ホスフェート(4MUP)

$\beta$ -D-ガラクトシダーゼ用：4-メチルウムベリフェニル- $\beta$ -D-ガラクトシド(4MUG)

【0025】(c) 発光基質

アルカリホスファターゼ用：3-(2'-スピアロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3''-ホスフォリルオキシ)フェニル-1, 2-ジオキセタン・2ナトリウム塩(AMPPD)

$\beta$ -D-ガラクトシダーゼ用：3-(2'-スピアロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3''- $\beta$ -D-ガラクトピラノシル)フェニル-1, 2-ジオキセタン(AMGPD)

パーオキシダーゼ用：過酸化水素と組み合わせたルミノール、イソルミノール

【0026】これら基質は、通常展開液中に添加して用いられるが、基質をマトリックス上に基質ゾーンとして設けることもできる。このマトリックスに基質ゾーンを設けるには、通常基質を溶液に溶解してマトリックスに添加した後、乾燥させることにより形成することができる。

【0027】さらに本発明の装置の態様として、毛細管作用により輸液可能なマトリックスに放射性同位元素、ラテックス、金属コロイド粒子、蛍光粒子又は着色粒子で標識された標識遺伝子組換え梅毒トレポネマ抗原と検体とを含む展開液を添加するための展開液ゾーンと、TP抗原をマトリックスに固定した検出ゾーンと、展開液吸収ゾーンとを設けた抗TP抗体の免疫分析装置を挙げることができる。

【0028】この分析装置は、展開液ゾーンに放射性同位元素、ラテックス、金属コロイド粒子、蛍光粒子又は

着色粒子で標識された標識遺伝子組換えTP抗原と検体とをそれぞれ添加するゾーンであることが前記装置とは相違する。この展開液ゾーンには前記標識遺伝子組換えTP抗原と検体とを含む溶液をそれぞれ添加する方法、標識遺伝子組換えTP抗原と検体との混合液を添加する方法により行うことができる。この展開液には、所望により前記界面活性剤、緩衝剤等を含む展開液を添加することができる。この展開液ゾーンに添加する標識遺伝子組換えTP抗原は、放射性同位元素、ラテックス、コロイド粒子又は着色粒子で標識された標識遺伝子組換えTP抗原であり、前記分析装置で用いた標識遺伝子組換えTP抗原の中から選択して用いることができる。さらにこの分析装置の検出ゾーン及び展開液吸収ゾーンは前記分析装置と同じゾーンとすることができる。

【0029】(使用方法)本発明の分析装置を用いて各種検体中の抗TP抗体の分析を行うことができる。この装置で分析を行うには、まず検体を装置のマトリックスに供給した後、展開液により展開を行う。展開液は毛細管作用により展開液吸収ゾーンに達し、検出ゾーンに結合されなかった検体中の成分、標識遺伝子組換えTP抗原が吸収され展開が完了する。展開終了後、検体液中の抗梅毒トレポネマ抗体に依存する量の前記検出ゾーンに固定化された標識物を直接的又は間接的に検出することにより抗TP抗体の分析を行うことができる。この検出は標識物によりそれぞれ対応する目視又はシンチレーションカウンタ、比色計、蛍光光度計、フォトンカウンタ、感光フィルム等の測定装置を用いて実施することができる。分析では、例えば酵素を標識物として用い発色基質により生成する色素の有無を定性的に目視で測定する方法が簡便である。またこの方法では抗TP抗体の濃度に対応した色票(カラーチャート)を用いることにより半定量的な分析が可能となる。

【0030】また、前記マトリックスは標識物の種類によりプラスチック、金属、紙等の支持部材上に積層し固定して用いることもできる。さらにマトリックスはプラスチック等のケースに固定し、展開液を含む液槽を展開液ゾーンに付設し前記各ゾーン部分に穴の開いたカバーをすることにより取扱の容易な装置を構成することができる。本発明の免疫分析装置では、検体として特に制限はなく例えば血清、血漿、全血、尿等の各種体液中の抗TP抗体の検出に適用することができる。

【0031】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明する。

【0032】実施例1 アルカリホスファターゼ標識された遺伝子組換えTP17抗原の作成  
特開平7-287017号に記載の方法に従い製造し、GSTの結合した遺伝子組換えTP17抗原0.12mgに2-イミノチオラン200nmolを加え、30℃で60分間放置し、チオール化TP抗原を得た。次にア



ルカリホスファターゼ 3mg に 300nmol の N-スクシンイミジル-4-マレイミド酪酸 (GMB S) を加え 30℃ で 60 分間放置し、マレイミド化アルカリホスファターゼを得た。その後前記チオール化 TP 抗原 100μg とマレイミド化アルカリホスファターゼ 2.5mg とを混合し、4℃ 一夜反応を行った後、ゲルろ過カラムにより未反応の抗原及び酵素を除いて、アルカリホスファターゼ標識した遺伝子組換え TP 17 抗原を得た。

#### 【0033】実施例2 抗TP17抗体分析用装置

図2に示すように幅5mm、長さ50mmのセルロース膜(ミリポア社製)のマトリックス1に上端から15mmの位置に実施例1で用いた同じ遺伝子組換えTP17抗原を塗布装置でライン状に点着後乾燥して検出ゾーン5を作成した。実施例1で製造したアルカリホスファターゼ標識された遺伝子組換えTP17抗原溶液20μlを幅5mm、長さ5mmに切ったポリビニルアルコール(PVA)シートに点着し乾燥したパッドをマトリックスの上端から25mmの位置に置き標識試薬ゾーン4と検体点着ゾーン3とした。またマトリックスの下端10mmの位置に幅5mm、長さ20mmのろ紙(ミリポア社製)を付設し、展開液ゾーン2とした。更に展開液吸収ゾーン6としてマトリックスの上端10mmの位置に幅10mm、長さ20mm、厚さ約1mmのろ紙を付設して抗TP17抗体分析用の装置を得た。

#### 【0034】実施例3 抗TP17抗体の測定

##### TP17抗体分析装置

間接凝集法(希釈倍率)

##### TP17, 47抗体

分析装置

陽性検体/検査検体(陽性率;%) (陽性率;%)

陽性検体(>1:80)	0/28 (0)	(0)
陽性検体(1:80)	2/2 (100)	(100)
陽性検体(1:160)	3/3 (100)	(100)
陽性検体(1:320)	15/15 (100)	(100)
陽性検体(1:640)	5/6 (83.3)	(100)
陽性検体(1:1280)	9/9 (100)	(100)
陽性検体(1:2560)	8/8 (100)	(100)
陽性検体(1:2560<)	18/18 (100)	(100)

#### 【0037】実施例5 抗17TP抗体及び抗47TP抗体分析用装置

図4に示すように幅5mm、長さ50mmのセルロース膜(ミリポア社製)のマトリックス1の上端から12mmの位置に組換えTP17抗原、17mmの位置に遺伝子組換えTP47抗原を塗布装置でライン状に点着後乾燥して検出ゾーン5及び8を作成した。実施例1で作成したアルカリホスファターゼ標識した組換えTP17抗原及び実施例3で作成したアルカリホスファターゼ標識

実施例2で作成した分析装置を用いて抗TP抗体の分析を行った。まず検体15μlを点着ゾーン3に添加後、0.3%の5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸(BCIP)を含有する溶液200μlを展開液ゾーンに滴下し吸収展開した。15分後に検出ゾーン5の呈色を目視判定した。ヒト血清検体89例について測定を行いその結果を表1に示す。着色が見られたものを陽性、着色が見られなかったものを陰性と判定した。また、同一の検体について、希釈列を作り従来の抗TP抗体の間接凝集免疫測定試薬(セロディアーTP・PA(登録商標);富士レビオ社製)で測定した結果を表1に示す。

#### 【0035】実施例4 抗TP47抗体の測定

ノルガード(Norgard)らの方法(INFECTION AND IMMUNITY, Vol.61, PP.1202-1210, 1993)に従い製造し精製した組換えTP47抗原を用いて、実施例1及び2の方法に従いアルカリホスファターゼ標識した組換えTP47抗原を作成し、さらに抗TP47抗体分析用の装置を得た。この装置を用いて表1に記載の検体について測定を行った。実施例3及び4の結果を表1に示す。実施例3及び4とを組み合わせて少なくとも一方の装置で陽性を示す検体を陽性判定とすると、すべての検体で間接凝集法と同じ結果を得た。

#### 【0036】

#### 【表1】

した組換えTP47抗原の混合溶液20μlを幅5mm、長さ5mmに切ったPVAシートに点着し乾燥したコンジュゲートパッドをマトリックスの上端から25mmの位置に置き標識試薬ゾーン4とした。また実施例2と同様に展開液ゾーン2と展開液吸収ゾーン6のろ紙を付設して抗TP17抗体及び抗47TP抗体分析用の装置を作成した。

#### 【0038】実施例6 抗17TP抗体及び抗47TP抗体の測定



実施例5で作成した装置を用いて間接凝集免疫測定法で陽性を示した検体について抗TP抗体の測定を行った。まず検体15 $\mu$ lを標識試薬ゾーン4に設けた点着ゾーン3に添加後、0.3%のBCIPを含有する溶液200 $\mu$ lを展開液ゾーンに滴下し吸収展開させた。15分後に検出ゾーン5及び8の呈色を目視判定した。着色が見られたものを陽性、着色が見られなかったものを陰性と判定した。

【0039】前記間接凝集免疫測定試薬で陽性又は陰性と判定された検体について、実施例5の分析装置で測定を行った。その結果を表2に示す。また、既知の梅毒感染初期検体、感染二期検体及び感染晩期検体についてそれぞれ間接凝集免疫測定及び実施例4の分析装置で測定を行った。その結果を表3に示す。

【0040】

【表2】

TP17, 47抗体分析装置

検体	間接凝集法	TP17	TP47
1	+	+	+
2	+	+	-
3	+	-	+
4	-	-	-

+: 陽性判定; -: 陰性判定

【0041】

【表3】

TP17, 47抗体分析装置

検体	間接凝集法	TP17	TP47
梅毒感染初期検体	+	±	+
梅毒感染二期検体	+	+	±
梅毒感染晩期検体	+	+	±

+: 陽性判定; ±: 弱陽性判定

【0042】実施例7 アルカリホスファターゼ標識TP15-17抗原の作成

TP15抗原とTP17抗原とが融合した遺伝子組換えTP15-17抗原を製造し、更に実施例1と同じ方法に従いアルカリホスファターゼ標識TP15-17抗原を得た。

【0043】実施例8 抗TP15-17抗体分析用装置

実施例2と同じ方法に従い、マトリックス1上に実施例7で製造したアルカリホスファターゼ標識TP15-17抗原及び遺伝子組換えTP15-17抗原とを点着し

て、抗TP15-17抗体分析用装置を得た。

【0044】実施例9 抗TP15-17抗体分析用装置

実施例8で作成した分析装置を用いて抗TP抗体の分析を実施例3の方法に従いヒト血清検体5例について行った。その結果を表4に示す。更に同一の検体について、前記間接凝集免疫測定試薬及び抗TP47抗体分析装置での結果を併せて表4に示す。

【0045】

【表4】

検体	間接凝集免疫	TP15-17抗体	TP47抗体
	測定試薬	分析装置	分析装置
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+/-	+	-
4	+/-	+	-
5	-	-	-

+: 陽性判定; +/-: 判定保留; -: 陰性判定

#### 【0046】

【発明の効果】本発明は、簡便かつ高感度に検体中の抗TP抗体の分析方法を提供する。この方法では、例えば血清中の抗TP抗体を約15分間で分析を行い結果を得ることができる。また抗TP抗体の抗体価が高い検体の測定時に観察されるプロゾーン現象は、本発明の分析方法では見られなかった。さらに本発明の方法を用いると検体中の複数の抗TP抗体を分別して分析できるため、感染時期を推定することができ、梅毒の治療にも有用である。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の免疫分析装置の態様の一例を模式的に示す平面図である。

【図2】本発明の免疫分析装置において、標識遺伝子組換えTP抗原を含むパッドからなる標識試薬ゾーンを付加した時の装置断面図である。

【図3】本発明の免疫分析装置において、マトリックス1に基質ゾーン7設けた時の装置断面図である。

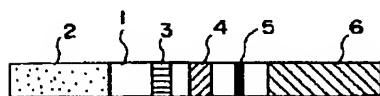
【図4】本発明の免疫分析装置において、マトリックスに2か所の検出ゾーン5及び8を設けた時の装置断面図である。

【図5】本発明の免疫分析装置の展開液ゾーン2に放射性同位元素、ラテックス、金属コロイド粒子、蛍光粒子又は着色粒子で標識された遺伝子組換えTP抗原と検体混合溶液9とを供給し測定する時の平面図である。

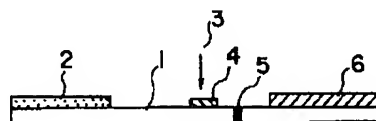
#### 【符号の説明】

- 1 マトリックス
- 2 展開液ゾーン
- 3 検体点着ゾーン
- 4 標識試薬ゾーン
- 5 検出ゾーン
- 6 展開液吸収ゾーン
- 7 基質ゾーン
- 8 検出ゾーン
- 9 標識遺伝子組換えTP抗原と検体との混合溶液

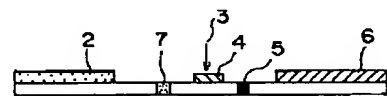
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】



【図5】

